Gedruckt mit Unterstützung aus dem Jerome und Margaret Stonborough-Fonds

Die Nitratassimilation der höheren Pflanze. I.

Von

Gustav Klein und Josef Kisser

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität in Wien
Nr. 217 der II. Folge

(Mit 1 Textfigur)

(Vorgelegt in der Sitzung am 25. Juni 1925)

Die Assimilation des Stickstoffs, die neben der CO_2 Assimilation wohl zu den fundamentalsten Prozessen der grünen Pflanze gehört, ist trotz zahlreicher Arbeiten auf diesem Gebiete in sehr vielen wesentlichen Punkten noch nicht geklärt. Das ist bei dem Prozesse, der von der anorganischen Stickstoffverbindung des Bodens bis zum Plasmaeiweiß der Zelle führt, nur verständlich. Während aber die Fragen, welche Verbindungen assimiliert werden können und werden und wo die anorganischen Stickstoffprodukte assimiliert werden, bereits eine gewisse Klärung gefunden haben (1), bestehen über den Chemismus dieses energetisch, chemisch und physiologisch so bedeutungsvollen Vorganges nur Hypothesen. Gerade die chemischen Vorgänge aber, die sich dabei abspielen, die Zwischenstufen, die der Organismus bei seiner eigenartigen chemischen Tätigkeit mit seinen spezifischen Mitteln der Energieverwendung und -verschiebung auf diesem langen Wege schafft und verwendet, sind vom biochemischen Standtpunkte aus das Interessanteste. Bei der Schwierigkeit der Materie sind freilich Hypothesen verlockend, dafür aber jeder Schritt, der mit exakten experimentellen Mitteln vorwärts gemacht wird, um so dankenswerter.

Die Verarbeitung der anorganischen Stickstoffverbindungen zum Eiweiß ist vom physiologischen wie methodischen Standpunkte in zwei Prozesse zu gliedern, in die eigentliche Assimilation des anorganischen Stickstoffs zum ersten organischen Stickstoffprodukt, zur Aminosäure, und in deren weiteren Aufbau zum Eiweißmolekül. Der letztere Vorgang ist im Wesen verständlich, seitdem chemisch prinzipiell der Abbau aller Eiweißformen zu einer Anzahl von Aminosäuren sichergestellt und E. Fischer (2) der Aufbau einfacher Eiweißkörper aus Aminosäuren gelungen ist, seitdem physiologisch feststeht, daß der Aufbau und Abbau von Reserveeiweiß im Organismus über Aminosäuren führt. Dagegen waren über die Assimilation des anorganischen Stickstoffs bis zum ersten organischen Stickstoffprodukt bei der höheren Pflanze fast keine sicheren Anhaltspunkte gewonnen. Wir haben uns zur Aufgabe gestellt, schrittweise die Wandlungen von Nitrat bis zur Aminosäure zu verfolgen und bringen im folgenden die ersten allgemeinen Resultate zur Kenntnis.

Die Schwierigkeit der Methodik und die lange Dauer der einzelnen Versuche lassen die immer neu aufspringenden Fragen nur langsam und schrittweise erledigen. Die vorliegenden Resultate, die bereits im Sommer 1924[1] im wesentlichen vorgetragen und im Laufe des letzten Jahres in vielem ergänzt wurden, können aus persönlichen Gründen erst jetzt zur Publikation gelangen.

Die Auffassungen über die Umwandlung von NO_3 bis zur Aminosäure lassen sich in zwei Gruppen zusammenfassen (1). Die einen Forscher nehmen eine unvollständige Reduktion von NO_3 zu einer reaktionsfähigen Zwischenstufe an; so V. Mayer die Bildung von Hydroxylamin, das mit Carbonylverbindungen zu Körpern der Oxyimidogruppe (mit der Isonitrosogruppe CNOH) oder mit Säuren zu Hydroxamsäuren vereinigt werden könnte, die dann zu Aminosäuren reduziert oder sonst umgelagert werden müßten.

Jüngst zeigten Baly und Mitarbeiter (3), daß mit ultraviolettem Licht in CO_2 haltigen Lösungen mit KNO_3 Formhydroxamsäure entsteht, ebenso mit Formaldehyd und KNO_3. Sie nehmen an, daß aus Formhydroxamsäure mit Formaldehyd das Hydrat der Blausäure entsteht, H—C—OH, das weiter zu Aminosäuren umgelagert

$$\begin{array}{c}\mathrm{H-C-OH}\\ \|\\ \mathrm{NH}\end{array}$$

werden soll. In der Tat erhielten sie mit Ninhydrin positive Reaktion; diese Reaktion ist allerdings für Aminosäuren nicht beweisend. Unter den Bedingungen erhielten diese Forscher auch Alkaloidkörper, was nur zeigen soll, daß vom chemischen Standpunkt verschiedenartige biologische Umwandlungen des NO_3 möglich sind.

Andere Forscher nehmen vollständige Reduktion des NO_3 an. So postuliert Franzen das Entstehen von Blausäure. Danach soll NO_3 durch Formaldehyd zu Nitrit und zu HCN reduziert werden. Diese soll mit Aldehyd Cyanhydrin geben, das mit NH_3 (!) das Nitril der Aminosäure und durch Reduktion dieses die Aminosäure liefert. In der Tat ist HCN sehr häufig in der Pflanze gefunden worden (Treub [5]), freilich immer nur in glykosidischer Bindung (Brunswik [6]). Nun stellen aber Glykoside effektive Nebengeleise im Stoffwechsel vor, was die Hypothese vom physiologischen Standpunkt sehr unwahrscheinlich macht. Von seiten der Chemiker ist sie als bedeutender, unerklärlicher Umweg abgewiesen worden. Die einfachste und natürlichste Annahme ist wohl die, daß das Nitrat zuerst vollständig zu NH_3 reduziert wird, das dann mit Aldehyden, Ketonen oder Säuren gekoppelt, beziehungsweise zu Aminosäure oxydiert werden soll (Loew, Erlenmayer). (Nach Loew soll Nitrat durch aktivierten Zucker reduziert werden, ähnlich wie in Vitro in alkalischen Zuckerlösungen bei Gegenwart von Platinmohr [7]). Als stickstofffreie Komplexe, die zur Koppelung mit NH_3 herangezogen wurden, nimmt Loew Formaldehyd, Trier Glycolaldehyd, Erlenmayer Glyoxylsäure, Smirnow nach Untersuchungen Knoops im tierischen Organismus Oxysäuren (Bernsteinsäure und Apfelsäure) an (1).

Daneben hält Kostytschew (8) auch eine Bindung von Nitrit mit Ketonen zu Isonitrosoketonen, die durch Reduktion und Spaltung der C-Kette zu Aminosäure führen, für möglich.

Tatsächlich wurde bisher nur die Reduktion der Nitrate zu Nitriten sowohl aerob wie anaerob unter sterilen Bedingungen einwandfrei nachgewiesen (Godlewski, Nabokich [9]).

Schreiner und Sullivan (10) sahen Weizenkeimlinge in halbwegs neutraler Lösung NO_3 zu NO_2 reduzieren, Davidson (11) negiert eine NO_2-Bildung im Außenmedium durch emporwachsende Weizenkeimlinge; seine Versuchsanstellung ist allerdings nicht

[1] Vortrag in der chem.-phys. Ges., Wien, Juni 1924, »Naturforscher-Versammlung« Innsbruck, Oktober 1924, »Naturwissenschaften«, 1925, XIII, p. 21.

überzeugend und einwandfrei. Nach Molisch (12) kann man in höheren Pflanzen normalerweise NO_2 nicht nachweisen, da es auch zugegeben rasch »zerstört« wird, ebensowenig in frischen Pflanzenextrakten. Einwandfrei konnte Klein (12) Nitrit nur in etiolierten Kartoffeltrieben und aus den Wurzelknöllchen der Leguminosen feststellen.

Jüngst hat Eckerson (13) recht auffällige Resultate bezüglich der Nitratreduktion in Tomaten bekanntgegeben. Tomatenpflanzen wurden nach guter Aufzucht erst NO_3 — frei im Lichte gezogen und gaben keinerlei Reaktionen auf Stickstoffverbindungen. Nach Nitratfütterung konnte NO_3 nach 24 Stunden in allen Teilen der Pflanze nachgewiesen werden. Nach dieser Zeit zeigte die Sproßspitze Nitrit, nach 36 Stunden alle Organe in Rinde und Phloemparenchym, nach 48 Stunden weniger NO_2 und mehr NH_3, nach 6 Tagen waren die anorganischen Stickstoffverbindungen nur mehr schwach, dagegen Aminosäuren reichlich nachzuweisen. Von diesen sollen Asparagin, Asparaginsäure, Alanin, Leucin, Cystin und Histidin festgestellt worden sein.

Abgesehen von allen prinzipiellen Bedenken eines derartigen Nachweises (siehe p. 4) kann man die Resultate nur mit sehr viel Skepsis betrachten. Alle Reaktionen wurden »mikrochemisch unter dem Mikroskope« durchgeführt, NO_2 nach Grieß und als Ag-Verbindung, NH_3 nach Neßler und als NH_4MgPO_4; von der Art des Nachweises der Aminosäure ist nichts angegeben. Nun ist NO_2 erwiesenermaßen höchst selten in der Pflanze zu finden (12), die Neßler'sche Reaktion besagt im Schnitt überhaupt nichts; den ersten Nachweis von Aminosäuren nebeneinander hat Werner (14) mikrochemisch geführt, der Nachweis im Gewebe steht noch aus. Ein histochemischer Nachweis von 6 Aminosäuren nebeneinander im Schnitt (darunter Cystin) erscheint mir absolut unmöglich. Ich habe mich nach Einsicht in diese Publikation kritisch bemüht, an steril gezogenen *Zea Mays*, *Phaseolus* und *Cucurbita* die Ergebnisse nachzuprüfen. Außer der Nitratreaktion mit Diphenylamin—H_2SO_4, mit der man die NO_3-Anreicherung recht gut verfolgen kann (15), habe ich, wie erwartet, keinen einzigen der genannten Körper sicher nachweisen können.

So einfach läßt sich der Wandel der Stickstoffverbindungen im Organismus bestimmt nicht führen.

Dagegen brachten die letzten Jahre bei niederen hetero- und autotrophen Organismen die ersten greifbaren Resultate über die Nitratassimilation. Kostytschew (8) zeigte, daß die Schimmelpilze *Aspergillus niger* und *Mucor racemosus* unter geeigneten Versuchsbedingungen Nitrat zu Nitrit und Ammoniak reduzieren und mit diesem und Zucker Aminosäuren synthetisieren. In diesen Versuchen war zum erstenmal die störende Bildung von Ammoniak durch Desaminierung ausgeschaltet. Die Reduktion zu NO_2 vollzieht sich ohne Zuckergabe, die weitere Verarbeitung von NO_2 ist nur bei Zuckergegenwart möglich.

In den dabei verwendeten kurzdauernden Versuchen waren die drei gefundenen Zwischenstufen Nitrit, Ammoniak und Aminosäure nur in der Lösung, nicht im Mycel nachweisbar. Kostytschew muß es dahingestellt sein lassen, ob die Reduktions- und Synthesevorgänge extrazellulär stattfinden oder intrazellulär und nachträglich ein Herausdiffundieren der angehäuften Zwischenprodukte eintritt. Eigene Ergebnisse über diese Vorgänge folgen an anderer Stelle.

Warburg (16) studierte die Nitratwandlung bei der einzelligen Grünalge *Chlorella*. Im Dunkel wurde aus Nitrat in salpetersaurer Lösung (Erhöhung der Konzentration nichtdissoziierter HNO_3-Moleküle) reichlich Ammoniak gebildet. Auch hier war das Ammoniak fast nur in der Lösung vorhanden, Warburg hält es für herausdiffundiert. Die gebildeten NH_4-Mengen sind anfänglich geringer als erwartet, und nehmen mit der Dauer des Versuches zu, N-hungerige Algen (nach vorhergehender N-freier Kultur) zeigen keine Ammoniakanreicherung. Danach ist im Experiment nur der Teil NH_3 faßbar, der nicht sogleich assimiliert wird. Die Mengen des nicht assimilierten NH_3 hängen vom N-Bedürfnis, beziehungsweise der N-Sättigung des Organismus ab. Ob die dabei gefundene Extrakohlensäure von der Oxydation organischer Säuren stammt, wie Kostytschew (17) annimmt, ist noch zu erweisen, wenn es auch manches für sich hat. Im Nitratgemisch, nicht in normaler Nährlösung tritt bei Narkose und ebenso bei Sauerstoffmangel unter gleichzeitigen Absterbeerscheinungen der Alge reichlich Nitrit auf. Das Absterben ist eine Nitritvergiftung. Danach wäre unter diesen Bedingungen die Nitritbildung kein physiologischer Vorgang, wäre jedenfalls von der Ammoniakbildung verschieden. Die jeweils gebildete Summe von NO_2 und NH_3 ist konstant; je nach dem Vorhandensein oder Fehlen von Sauerstoff herrscht der eine oder der andere Vorgang mehr minder ausschließlich vor. Bei Belichtung steigt die NH_3-Produktion um das Zwei- bis Dreifache an. Dabei wirkt nach den energetischen Bestimmungen das Licht nicht als Energiequelle für die Assimilation, wie ja oft angenommen wurde, sondern wahrscheinlich, wie auch anderwärts gezeigt werden konnte (Tröndle [18]), als permeabilitätssteigernder Faktor.

Physiologische Methodik.

Die großen Vorteile, die die submers lebenden einzelligen oder doch einfach organisierten Pflanzen (Algen und Pilze) einer Bearbeitung bieten, fallen bei der höheren Pflanze weg. Der Hauptgrund, daß eine Analyse dieses grundlegenden Prozesses bei der höheren Pflanze nicht geführt werden konnte, liegt in der hohen Bau- und Funktionsorganisation dieser. Wenn auch allen bisher gefundenen Tatsachen zufolge (1) jede Zelle der höheren Pflanze zur Stickstoffassimilation unter gegebenen Bedingungen befähigt ist, erscheint uns vorläufig die experimentelle Verfolgung dieses Vorganges an sekundärer Lagerstätte, wo primäre, sekundäre etc.

Umwandlungen nebeneinander- und durcheinanderlaufen, wo primäre, sekundäre, tertiäre etc. Wandlungsstufen des Stickstoffs vorliegen, so lange unmöglich, als diese einzelnen Stufen nicht unterschieden und auseinandergehalten werden können. Deshalb war für das Gelingen derartiger Versuche der Ort, an dem Umwandlungsstufen, Zwischenprodukte der N-Assimilation gesucht werden sollten, ausschlaggebend. Als primäre Wandlungsstätte kam dann nur die Aufnahmsstelle der Stickstoffsalze, die Wurzelregion in Betracht, die damit der gesamten aufnehmenden Oberfläche der einfachen und submers lebenden Objekte von Kostytschew und Warburg entspricht.

Bestärkt wurden wir hierin durch frühere Befunde des einen von uns, daß N-, P- und Fe-Salze bei geeigneter Versuchsanstellung (geringe Konzentration der betreffenden Salze, Nitrat 0·005 $^0/_0$, um einen nicht verarbeitbaren Überschuß zu vermeiden) in einigen Zentimetern Entfernung von der aufnehmenden Wurzelhaarregion nicht oder nur mehr schwach in anorganischer Form nachweisbar waren, also schon hier in organische Verbindungen umgewandelt sein mußten. Ebenso sprechend sind die Befunde, daß der Wurzel gebotene Ammoniumsalze in den oberirdischen Organen nicht mehr, bei großem Überschuß nur in geringen Mengen greifbar sind und daß auch der Nitratgehalt von der Wurzel bis zum Sproßgipfel rasch und bedeutend (selbst bei ausgesprochenen NO_3-speichernden Pflanzen) abnimmt.

Voraussetzung wieder für die eindeutige Feststellung von primären Zwischenstufen der Nitratassimilation war allerdings eine absolut sterile, leicht zu handhabende Kulturmethode. Denn es ist klar, daß bei der allgemeinen Verbreitung und hohen Aktivität von denitrifizierenden Bakterien und Pilzen und von nitrifizierenden Bakterien nur mit absolut sterilem Wurzelsystem gearbeitet werden kann, sollen nicht alle Befunde undiskutierbar werden. Die Kulturmethode, die wir uns nach vielen Versuchen geschaffen haben (19), soll im Anhang kurz dargestellt werden.

Als Versuchspflanzen verwendeten wir *Zea Mays* (Sorte weißer Zuckermais, 100 $^0/_0$ Keimfähigkeit, die harten, runzligen Samen sind bei der Sterilisation sehr resistent und keimen schnell und kräftig, das Endosperm ist in drei Wochen entleert) als Kohlehydrattypus — reich an Kohlehydraten, arm an organischen N-Reserven — und *Phaseolus multiflorus* (kleine weiße, quantitativ und schnell keimende Sorte, Kotyledonen in längstens vier Wochen entleert und abgefallen), als Leguminosentypus, reich an N-Reserven und hier auch an Kohlehydraten. Die Pflanzen wurden bis zum eigentlichen Versuch in folgender Nährlösung gezogen:

Auf einen Liter destilliertes Wasser 0·5 *g* $CaSO_4$,[1]
0·25 *g* $MgSO_4$,

[1] Ca wurde absichtlich in größerer Dosis zur Vorbehandlung verwendet, da ja Ermakow die bedeutend fördernde Wirkung von Ca auf die Stickstoff-

Auf einem Liter destilliertes Wasser $0 \cdot 25\,g$ KH_2PO_4,
$0 \cdot 12\,g$ KCl,
Spur $FeCl_3$ und eventuell
Spur $MnSO_4$.

Erst zur Zeit, wo nach Kontrollpflanzen die Reservestoffbehälter entleert waren und aus N-Mangel Wachstumstillstand eintrat, wurde entweder die ursprüngliche Lösung komplett gegen die Versuchslösung ausgewechselt oder zur alten Lösung die spezifischen Versuchsstoffe steril zugeführt.

Zu dieser Zeit waren die Kulturgefäße schon dicht mit blendend weißen, reich verzweigten Wurzeln erfüllt. Vor und nach Versuchsbeginn und während der Versuchsdauer wurden Sterilitätsproben in Fleischbouillon und Giltay'sche Nährlösung (denitrifizierende Bakterien) entnommen. Vom Zeitpunkte der Wurzelausbildung an wurde täglich gründlich durchlüftet.

Geboten wurde je nach der Fragestellung 0·01 bis 0·2 norm. KNO_3, 0·2 norm. KNO_3 und 0·01 norm. HNO_3 und 2 bis 5% Traubenzuckerlösung. Es braucht nicht besonders betont zu werden, daß nur reinste Präparate, noch zweimal umkrystallisiert, Verwendung fanden, wobei speziell auf Freisein von Nitrit und Ammoniak geachtet wurde.

Chemische Methodik.

Die NO_2-Bestimmung wurde sowohl qualitativ wie quantitativ nach dem kolorimetrischen Verfahren von Grieß-Ilosvay (20) durchgeführt. Die Bestimmung ist so einfach und scharf, daß wir sie jeder anderen vorzogen (siehe auch Kostytschew und Warburg).

Die Ammoniakbestimmung verlangt weitaus mehr Kautelen. Nur in den Lösungen, die frei von organischen Stoffen waren, war eine direkte kolorimetrische Messung mit Neßlers Reagenz möglich (21).

Schon in älteren anorganischen Kulturlösungen gibt die Bestimmung ein falsches Bild, da die reichlich ausgeschiedenen Lipoide an und für sich und durch ihren Zuckergehalt (nachweisbar nach Hansteen-Cranner [22]) eine NH_3-Reaktion vortäuschen. In den zuckerhaltigen Nährlösungen ist das direkte Neßlerisieren natürlich ausgeschlossen, aber auch nach Abdestillieren des NH_3 aus der alkalisierten Lösung am Vakuum erwies sich die Prüfung

---

assimilation, Smirnow J. A. auf Kohlehydratverbrennung und Wachstum wiesen haben.

Ermakow W. P., Nachr der Univ. Kiew, 1908, *48*, I.

Smirnow A. J., Zeitschr. für Pflanzenernährung und Düngung, 1924, *3*, 30—40.

mit Neßler unmöglich. Wir erhielten auf diesem Wege eine überaus starke Reaktion, bei deren Überprüfung sich herausstellte, daß sie nicht vom NH_4 stammt, sondern von Aldehyden, die bei der alkalischen Destillation von mehr als 1% Zuckerlösungen entstehen und übergehen und durch ihre Reduktionswirkung die Reaktion vortäuschen.[1]

Um alle diese Fehler auszuschalten, bestimmen wir das NH_3 in allen Fällen durch Destillation in gestellte Schwefelsäure, die wir wie bei der Kjeldahlbestimmung mit Lauge zurücktitrieren. Als exaktestes Destillationsverfahren hat sich in Kontrollversuchen die Kombination der Apparatur nach Krüger-Reich (23) und Revoltella (24) erwiesen, die absolut quantitative, sichere und schnelle Bestimmung gestattet.

Die Aminosäurebestimmung wurde nach van Slyke (25) durchgeführt. Eine auch nur qualitative Bestimmung mit Ninhydrin hat sich durch die zahlreichen Fehlerquellen bei Pflanzen als unzulänglich erwiesen (4). Die Festlegung des Atmungsaldehyds wurde nach bewährter Methode (26) folgendermaßen durchgeführt: Die Nährlösung wurde zu Beginn des Versuches mit Dimedon (1 1000) versetzt, nach Abbruch des Versuches wurden die Wurzeln mit alkalischem Wasser verrieben und zweimal ausgezogen, um das leicht lösliche Aldomedon quantitativ zu extrahieren, die vereinigten alkalischen Filtrate mit HCl angesäuert und gegen Petroläther, in den das Aldomedon aus saurer Lösung fast vollständig übergeht, lange genug ausgeschüttelt; der Petroläther im Vakuum vertrieben, der Rückstand mit einigen Tropfen Alkalicarbonat aufgenommen und mit Phosphorsäure neutralisiert. Diese 1 bis 2 cm^3 bildende Lösung wurde mikro in eine gekühlte Dimedonvorlage destilliert; das in der Vorlage entstandene, krystallisierte Acetaldomedon (4 bis 10 *mg*) wird gewaschen und mit Mikroschmelzpunktsapparatur (F.-P. = 139°) identifiziert.

Bei derart diffizilen Versuchen mit kleinsten Mengen — die großen NO_2-Mengen bei Warburg sind wahrscheinlich auf Infektion oder abnorme Verhältnisse zurückzuführen — war, abgesehen von Störungen durch Infektionen, vorher jede Fehlerquelle aufzusuchen und genauestens zu überprüfen. Hierher gehören in erster Linie alle Veränderungen des Nitrates, die in vitro festgestellt wurden, als Reduktionen des NO_3 durch reduzierende organische Substanzen (Aldehyde, Zucker), durch die reduzierende Wirkung von Ferroverbindungen für sich, respektive unter der Einwirkung von Licht, speziell von ultraviolettem Lichte.

So konnten Baudisch und Mayer (27) zeigen, daß Nitrit von überschüssigem Ferrohydroxyd in alkalischer Lösung, Nitrat in alkalischer und neutraler Lösung zu NH_3 reduziert wird und haben ja auch eine quantitative NO_3- und NO_2-Bestimmung darauf aufgebaut. Für uns war die Möglichkeit der Reduktion durch die

[1] Eine genauere Untersuchung dieser Aldehydabspaltung folgt an anderer Stelle.

freilich geringen Eisenmengen in der Nährlösung zu berücksichtigen und Baudisch's bedeutende Mengen von NO_2 und NH_3 sind bei geringsten Eisenmengen in Gegenwart von Glukose in alkalischer Lösung allerdings bei hoher Temperatur festgestellt worden. Wir haben mit Ferro- und Ferrisalzen ebenso wie mit dem Ferrum hydrox. dialys. liqu. in Licht und Dunkel bei hoher und niederer Temperatur keine Reduktion gefunden. (Siehe auch Tabelle I.)

Tabelle I.

Vergleichsweise wurde folgende Serie in mit Watte verschlossenen Erlenmayerkölbchen aufgestellt:

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	Temperatur	Licht oder Dunkel	P'' der Lösung	KNO_2-Menge nach 2 Tagen
1	2% KNO_3+Fe 0·01%	18°	D.	5·9	+
2	detto	18	U. v. Licht	5·9	+
3	2% KNO_3+1% Acet.	18	D.	5·9	—
4	detto	18	L.	5·9	—
5	2% KNO_3+Fe	18	D.	5·9	—
6	detto	18	L.	5·9	—
7	KNO_3+Fe	18	D.	8·3	—
8	detto	18	L.	8·3	+
9	KNO_3+Acet.	18	D.	8·3	—
10	detto	18	L.	8·3	+
11	KNO_3+Acet.+Fe	18	D.	8·3	
12	detto	18	L.	8·3	—
13	KNO_3+Fe	40	D.	8·3	Spur
14	KNO_3+Acet.	40	D.	8·3	+
15	KNO_3+Acet.+Fe	40	D.	8·3	—
16	KNO_3+1% H_2O_2	18	D.	8·3	—
17	KNO_3+1% H_2O_2+Fe	18	D.	8·3	—
18	KNO_3+Acet.+H_2O_2	18	D.	8·3	—
19	KNO_3+Acet.+H_2O_2+Fe	18	D.	8·3	—

Ein Blick auf die Tabelle zeigt, daß die gelegentlichen positiven Reaktionen nur zufälligen, schwach entwickelten Infektionen entsprechen können.

Unter halbwegs natürlichen Bedingungen ist also eine NO_3-Reduktion bei Gegenwart von reduzierender organischer Substanz und katalytisch wirkendem Fe in unseren Versuchen nicht festzustellen.

Laurent (28) fand in reinsten sterilen NO_3-Lösungen im starken Tageslicht NO_2, allerdings nach Monaten, was Baudisch bestätigte, ebenso zeigten Baudisch und Mayer (29) in violettem und ultraviolettem Licht Umlagerungen von Nitraten und Nitriten. Kontrollversuche unter unseren Versuchsbedingungen waren negativ. Auch durch Peroxydwirkung (H_2O_2) konnte unter unseren Versuchsbedingungen eine Reduktion mit und ohne Eisenkatalyse nicht nachgewiesen werden.

Die angegebene Nährlösung gab mit KNO_3 bei Zimmertemperatur und nach Kochen keine NO_2-Reaktion.

Ebensowenig $KNO_3 + HNO_3$, auch nicht nach dem Sterilisieren im zugeschmolzenen Röhrchen. Ebenso gab die komplette Lösung mit Nitrat, Salpetersäure und Zucker negative Nitritreaktion.

Vergleichsweise wurden Lösungen von KNO_3 (1%) und Zucker (5%) sauer, neutral und alkalisch, mit und ohne Fe ($FeSO_4$ von 0·001 bis 1%) unter Watteverschluß zweimal sterilisiert und sowohl nach dem Abkühlen wie nach verschieden langem Stehen im Dunkeln, im Tageslicht und im ultravioletten Licht einer Quarz-Quecksilberdampflampe auf NO_2 und NH_4 geprüft. Sie gaben unter allen Umständen negative Resultate, nach wenigen Stunden bis Tagen aber starke NO_2-Reaktionen, wenn der Wattestöpsel für 10 Sekunden geöffnet worden war (Tab. I).

Ebenso mußte darauf geachtet werden, daß in den Versuchsräumen nicht NO_2 gasförmig vorhanden ist, was in chemischen Arbeitsräumen, Thermostaten etc. recht häufig der Fall ist.

Versuchsergebnisse.

Wurden die Pflanzen nach der N-freien Kultur mit 0·2 norm. bis 0·01 norm. KNO_3 versehen, so zeigte sich vom zweiten bis achten Tag regelmäßig folgendes Bild: In der Nährlösung Nitrit abnehmend **—0, NH_4 0—**—0. Die dabei auftretenden Megen an Nitrit und Ammoniak waren also einwandfrei nachweisbar und qualitativ verfolgbar, wenn auch gering.[1] Deshalb wurden verschiedene Möglichkeiten versucht, eine Anreicherung der Zwischenprodukte zu erzielen, was auf verschiedenen Wegen gelang.

Durch Darreichung von KNO_3 und HNO_3 nach Warburg (16) wurde die Zahl der nicht dissoziierten NO_3-Moleküle gesteigert, was eine auf das Mehrfache gesteigerte Ausbeute an Zwischenprodukten zur Folge hatte. Das Ph bewegt sich dabei je nach der HNO_3-Menge zwischen 4 und 3, was von unseren Versuchspflanzen auch eine Woche ohne Schädigung ertragen wurde.

---

[1] Die relativ geringen Mengen, die gegriffen werden konnten, liegen im Wesen der schnell weiterverarbeiteten, beziehungsweise aufgenommenen Zwischenstufen. Größere Quantitäten von diesen sind immer kritisch zu beurteilen und meist auf Fehlerquellen zurückzuführen.

Oder die Pflanzen wurden bei Kohlehydratreichtum (Kultur im guten Licht oder auf Zuckerlösungen) möglichst lange bei N-Hunger gezogen, wobei dann eine auf das Vielfache gesteigerte Umsetzungsgeschwindigkeit der nachträglich gebotenen Nitrate in den ersten Tagen festzustellen ist.

Oder man sättigt im Gegenteil vorher mit Nitrat und bietet nachträglich noch HNO_3, wobei die Umsetzungsgeschwindigkeit wohl relativ geringer, wahrscheinlich durch langsamere Umsetzung der Zwischenprodukte aber deren greifbare Menge doch absolut größer wird.

Endlich ist eine Möglichkeit der Anreicherung, speziell von Nitrit durch Alkalischhalten der Nährlösung gegeben, über die erst in einer nächsten Mitteilung ausführlicher berichtet werden soll.

Alle vier skizzierten Möglichkeiten der Anhäufung von Zwischenstufen hatten Erfolg.

Dabei konnte nun zum erstenmal der Einfluß von Kohlehydraten und von Licht auf die grünen Organe und die farblosen N-assimilierenden Wurzeln (vorläufig qualitativ) getrennt untersucht werden, womit eine Auseinanderlegung und Analyse der Faktoren möglich erscheint. Die quantitativen Bestimmungen geben wir vollständig in der zweiten Mitteilung.

Als allgemeine Regel ergab sich folgendes:

Bei rein anorganischer Kultur (ohne Zucker) tritt hauptsächlich NO_2 auf, wenig NH_4. (Die Nitritmengen bewegen sich zwischen 3 und 10 *mg* pro 1 *l*.)

Bei Zuckerdarbietung ist nur anfänglich und recht wenig NO_2 greifbar, dafür aber beträchtlich NH_4.

Die Erklärung hierfür scheint uns die: Im ersten Falle ist die Reduktion von NO_2 zu NH_4 eine langsame, der NH_4-Verbrauch ein energischer, die greifbare NH_4-Menge demnach gering. Im zweiten Falle ist die endotherme Reduktion ($HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2O_2 -$ 68000 cal.) von NO_2 zu NH_4 beschleunigt, daher mehr NH_4 jeweils greifbar. Ein Entstehen des gefundenen NH_4 auf dem Wege der bekannten Desaminierung an Aminosäuren ist bei der hier vorliegenden reichlichen Zuckerversorgung ausgeschlossen. Das in der Nährlösung nachweisbare NH_4 präsentiert sich ausschließlich als Reduktionsprodukt der Nitrate.

Pflanzen mit dunkel gehaltenen Wurzeln zeigen bei gleichzeitig belichteten Blättern viel NO_2 und auch etwas NH_4, bei verdunkelten Blättern (Kohlehydratmangel) wenig NO_2 und fast kein NH_4.

Belichtete Wurzeln zeigen unter sonst gleichen Umständen weit mehr NO_2 und auch NH_4 als verdunkelte.

Um den spezifischen Lichteinfluß bei nicht grünem Gewebe klarzulegen, wurde von Kulturen mit verdunkelten Sprossen vergleichsweise normalem direkten Tageslicht und dem U.-V.-Licht einer Quarz-Quecksilberdampflampe (Heräuslampe) exponiert. Die spezifischen ultravioletten Strahlen werden durch die Glaswand des

Kulturgefäßes natürlich vollständig absorbiert. Wirksam können nur die reichlichen blauen und violetten Strahlen sein. Die Lichtstärke beider Lichtarten waren annähernd gleichgemacht. Die Wirkung des an kurzwelligen Strahlen reichen Lichtes war deutlich genug. In zuckerfreien Kulturen stieg erst der NO_2- und dann der NH_4-Gehalt um 50 bis 70%, in zuckerhaltigen Kulturen stieg der NH_4-Gehalt bis aufs Doppelte.

Ob die hier je nach den verschiedenen Versuchsbedingungen gefundenen, verschieden großen Mengen der Zwischenprodukte NO_2 und NH_4 in einer Reaktionskette liegen, die unbedingt über NH_4 zum organischen N-Produkt führt (was manches für sich hat), oder ob jedes von diesen in einer eigenen Reaktionsfolge in organische Form gebracht wird, was ja theoretisch möglich ist, ist nicht von vornherein zu entscheiden und bedarf einer eingehenden Untersuchung. Vorher sind wir der plausiblen Möglichkeit der Koppelung von NH_4 zur Aminosäure nähergetreten. Die Versuche sprechen dafür, daß die N-freien Komplexe, die sich mit NH_3 koppeln, aus der Atmungskette stammen oder doch mit der Atmung in Zusammenhang stehen. Von Parallelversuchen wurden die einen auf 0·2 norm. KNO_3 mit 0·01 norm. HNO_3 und 5% Zucker, die andern noch dazu auf 1% Dimedon (Dimethylhydroresorzin als Abfangmittel für den Atmungsaldehyd) gebracht. Während der sechstägigen Versuchsdauer ergaben die entnommenen Proben aus den Dimedonkulturen ungefähr die doppelte Menge NH_4 als aus den Parallelversuchen ohne Dimedon. Bei Abbruch des Versuches zeigten die Dimedonkulturen 4 bis 6 *mg* NH_4, die dimedonfreien 1·7 bis 2·6 *mg* pro 1 *l*. Aus Wurzeln und Lösung wurde einwandfrei das abgefangene Acetaldomedon dargestellt. Wenn auch nur ein Teil des Atmungsaldehydes abfangbar ist, genügte die Menge, um das Quantum des unverbrauchten NH_4 aufs Doppelte zu erhöhen. Ausführliche Untersuchungen über die Natur der zur Aminosäurekoppelung verwendeten N-freien Komplexe sind im Gange.

Prinzipiell erscheint es, daß Nitrit niemals mit Sicherheit in den Wurzeln, sondern immer nur im Außenmedium gefunden werden konnte. Das Ammoniak findet sich im Außenmedium und in den Wurzeln, in letzteren reichlicher bei Kulturen ohne Zucker als in den zuckerhaltigen. Bei ersteren kommen natürlich nur belichtete Kulturen in Betracht, um die Gefahr der Ammoniakbildung durch Desaminierung zu vermeiden.

Aminosäuren konnten in der Nährlösung nie auch in Spuren gefunden werden, wohl aber in den Wurzeln in verschieden reichlicher Menge, je nach der Größe der N-Assimilation.

Nitrat ist bei größerer Gabe in den Wurzeln reichlich nachweisbar und nimmt von den submersen Wurzeln gegen die Sproßspitzen zu ständig ab. In der Natur kommt allerdings N-Überfluß mit Ausnahme der Nitratpflanzen und reichlich gedüngter Gewächse nie vor. Jedenfalls wandert aber bei reichlicher Fütterung ein Teil des Nitrates anorganisch in Stengel und Blätter. Der übrige Teil

wird schon in oder an der Wurzel verarbeitet. Für diesen Teil ist zu entscheiden, ob er in der Wurzel entsteht und unter den Versuchsverhältnissen nachträglich ins Außenmedium diffundiert oder ob er im Außenmedium reduziert und als Ammoniak dann von der Wurzel absorbiert wird. Für diese letztere Möglichkeit spricht schon die Tatsache, daß Nitrit nur im Außenmedium gefunden wird. Höchstwahrscheinlich wird diese Annahme, wenn, was ja dann gefordert werden müßte, im Außenmedium die Faktoren gegriffen werden könnten, welche die Reduktion, einen typisch endothermen Vorgang, bewerkstelligen.

Nun kann man in der Kulturflüssigkeit jeder älteren Kultur nach den Hansteen'schen Methoden (22) beträchtliche Mengen von Lipoiden darstellen, die als Vehikel für Exoenzyme fungieren könnten.

In der Tat haben wir aus jeder Kulturflüssigkeit Rohenzyme dargestellt, die in vitro in Nitratlösungen, welche mit reichlich Toluol steril gehalten wurden, dieselbe Reduktion zu NO_2 und NH_4 durchführen. Die Nährlösung wurde direkt oder nach Einengung im Vakuum bei 40° mit der doppelten bis dreifachen Menge abs. Alkohol versetzt, die weiße Fällung rasch abgesaugt, mit Toluol zum größten Teil vom Fett befreit, mit abs. Alkohol nachgewaschen, auf Glasplatten rasch getrocknet, in Glyzerinwasser (1 1) aufgenommen, filtriert, aus dem Filtrat das Enzym mit Alkohol gefällt und diese Reinigung wiederholt. Dasselbe erhielten wir aus den Wurzeln und sterilen keimenden Samen von *Zea Mays* und *Phaseolus*. Die Umsetzungskapazität dieser Rohenzyme war größer als die von gleichzeitig in Iterson- oder Giltaynährlösung geimpften, reinkultivierten Denitrifikationsbakterien.

Bei den Enzymen aus NO_3-Kulturen ohne Zucker war reichlich NO_2 und fast kein NH_4, bei den Enzymen aus Zuckerkulturen NO_2 und NH_4, dieses freilich weniger als NO_2 greifbar. Da die Reduktion von NO_3 zu NO_2 und NH_4 ein endothermer Vorgang ist, der speziell für die NH_4-Bildung größere Energiemengen erfordert, ist das Ausbleiben der NH_4-Bildung bei Enzymen aus rein anorganischen NO_3-Kulturen (aus denen höchstens Lipoide mitgerissen werden können) im Gegensatz zu denen aus Zuckerkulturen klar, ebenso das Auftreten von NO_2 und NH_4 bei den Wurzelenzymen (Gegenwart von mitgefällten organischen Körpern, autoxydablen Lipoiden) wohl verständlich. Eingehendere Angaben folgen.

Reduktionsmechanismen sind in Pflanzenextrakten ja wiederholt festgestellt worden. Nach Mazè (30) geben Pflanzenextrakte, auf 105° erhitzt, steril schon nach einigen Tagen Nitrit. Bach (31) hat diese Versuche wiederholt und bestätigt. Er findet in nicht erhitzten Extrakten die NO_3-Bildung viel stärker, Nitrate geben mit Fällung von Kartoffelextrakt bei Aldehydgegenwart und 50° reichlich NO_2, ohne Aldehyd wenig.

Kochen inaktivierte seine Perhydridase. Allerdings trat nach einiger Zeit mit und ohne Luftzutritt wieder NO_2 auf, was Bach (31) als zwei ganz verschiedene Prozesse erklärt. Er hält den Prozeß aber sicher nicht für eine Reduktion von NO_3, sondern für eine oxydative Wirkung.

Tabelle II.

Nr.	Rohenzym aus	Zusammensetzung der Lösung	Ph	Enzym intakt oder gekocht	NO_2-Reaktion nach dreitägigem Stehen bei 30°
1	*Zea Mays*-Wurzeln	1% KNO_3		intakt	++++
2		detto	7·2		+
3			8·2		++++++
4	*Zea Mays* oberirdische Organe				+++
5	detto				+
6	detto		8·2		—
7	Wurzeln	1% KNO_3+ 5% Zucker			infiziert
8	Oberirdische Organe	detto			
9	Wurzeln	1% KNO_3		am Wasserbad gekocht	+++
10		detto			+
11			8·2		+++++
12	Oberirdische Organe				+++
13					+++
14			8·2		+++++
15	Wurzeln	1% KNO_3+ 5% Zucker			infiziert
16	Oberirdische Organe	detto			

Alle Versuche waren reichlich mit Toluol versetzt und wurden nach dem Abbrechen auf nitratreduzierende Bakterien geprüft.

Ähnliche Wirkungen fand Pozzi-Escot (32) in Klettenwurzeln bei alkalischer Reaktion, Kastle und Elvove (33) in Knollen etiolierter Sprosse von Kartoffeln in schwach saurer Lösung. Eckerson (13) fand in Tomaten eine aktive Substanz, die unter gegebenen Bedingungen NO_3 zu NO_2 sehr stark, NO_2 zu NH_3 schwach reduziert. Diese Resultate wurden mit Pflanzenextrakten und mit Alkoholfällungen aus diesen in schwach alkalischer Lösung (Ph = 7·6) bei Gegenwart von reduzierenden Substanzen (Acetaldehyd, Zuckerarten) erhalten, allerdings bei 50°

Zum Beispiel geben 10 *cm*³ Extrakt mit 10 *cm*³ H_2O+0·2 *g* KNO_3+ 0·1 *g* Fruktose+0·6 *cm*³ 0·1 norm. NaOH (Ph 7·6) bei 50° in 20 Stunden 50 *mg* NO_2). Gekochter Saft reduziert nicht, weil er beim Kochen sauer wird; auf Ph 7·6 gebracht, wirkt er wie ungekochter. Eckerson läßt es dahingestellt, ob ein Enzym oder sonst ein organischer Körper oder Fe der wirksame Bestandteil ist.

Tabelle III.

Nr.	Rohenzym aus	Lösung enthält	Nitrit nach zwei Tagen	Nitrit nach einer Woche	Nitrit nach zwei Wochen
1	Nährlösung von *Aspergillus niger*	in dest. Wasser 1% KNO_3	++	++++	++++
2	Hyphen von *Aspergillus niger*		+++	++++	++++++
3	*Lupinus angustifolius*		+	++++	+++++
4	*Zea Mays* (Zuckermais)		+	+++	+++++
5	*Triticum vulgare* (Melker Weizen)		++	+++	++++++
6	Kontrolle I ohne Enzym		—	—	—
7	Kontrolle II ohne Enzym	1% KNO_3+ 5% Zucker	Spur	—	—
8	Nährlösung von *Aspergillus niger*		++	++++	+++++
9	Hyphen von *Aspergillus niger*		+	+	++
10	*Lupinus angustifolius*		+	+++	+++++
11	*Zea Mays*		+++	++	++++
12	*Triticum*		++	+++	+++++

Gegen Fe spricht nach ihrer Ansicht die Tatsache, daß Licht keinen fördernden Einfluß auf die Reduktion hat, was nach Neuberg (34) eintreten müßte. Die starke Wirkung bei schwach alkalischer Reaktion stimmt mit ihren Ergebnissen in der Pflanze überein. Abgesehen davon, daß hier ein ganz anderer Mechanismus, als es die Reduktion in der Pflanze ist, mitspielen könnte, kann ein Versuch in vitro bei 50° wohl nicht direkt auf die Vorgänge in der Pflanze angewandt werden.

Schließlich beschäftigte sich Anderson (35) ganz kritisch mit der NO_3-Reduktion in Pflanzensäften und dem Vorkommen von

NO_2 in der Pflanze. Er fand NO_2 auch im grünen Sproß von *Solanum dulcamara* und einigen anderen etiolierten Pflanzen im Herbst, dagegen nicht im Sommer; er fand den mannigfach untersuchten Stoff im Kartoffelextrakt thermolabil und durch Ammonsulfat ausfällbar und hält ihn für ein Ferment; seine Wirkung ist ganz ungleich und unsicher. Er kritisiert besonders die unnatürlichen Bedingungen, wie Sauerstoffabschluß, bedeutende Acetaldehydzugabe und die hohe Versuchstemperatur (45 bis 50°). Er läßt daher mit Recht im Zweifel, ob dieser Mechanismus wirklich bei der Proteinsynthese eine Rolle spielt (siehe Bach [31]).

Aus all den Angaben ist nur ersichtlich, wie different die Ergebnisse mit Rohenzymen oder wie man diese reduzierenden Agentien nennen mag, sind. Die folgenden Tabellen geben eine kleine Übersicht der Wirkungsweise des aus Nährlösungen, Wurzeln und oberirdischen Organen dargestellten Körpers. Jedenfalls ist die Reduktion im alkalischen Medium optimal und tritt auch nach Erhitzen des gefällten Extraktes auf.

Schließlich sei uns noch gestattet, der Akademie der Wissenschaften in Wien für eine Unterstützung, die wir aus der Czermakstiftung für diese Arbeit erhielten, unseren ergebensten Dank auszusprechen.

Zusammenfassung.

Unter absolut sterilen Kulturbedingungen und Ausschluß aller Fehlerquellen chemischer und physiologischer Natur, die in Betracht kommen könnten, wurden die ersten Umwandlungsstufen des Nitrates bei der Assimilation an primärer Lagerstätte, in der Wurzel, untersucht.

Stickstofffrei gezogene Pflanzen von *Phaseolus* und *Zea Mays* zeigten nach Nitratfütterung vorübergehend NO_2- und NH_4-Bildung im Medium.

Eine Anreicherung gelang durch Steigerung der nicht dissoziierten NO_3-Moleküle (Warburg), durch möglichst langen Stickstoffhunger bei Kohlehydratreichtum und nachträgliche Stickstoffzugabe, durch vorhergehende Stickstofffütterung und nachträgliche Behandlung nach Warburg und schließlich durch Kultur in alkalischer Nitratlösung.

In allen Fällen trat bei anorganischer Nährlösung hauptsächlich NO_2 auf, wenig NH_4.

Bei Zuckerfütterung vorübergehend NO_2 und recht reichlich NH_4.

Die weitere Koppelung des NH_4 zu Aminosäuren geht wahrscheinlich über Atmungsprodukte, da durch Abfangung des Atmungsaldehydes NH_4-Anreicherung festgestellt werden konnte.

Nitrite konnten nur in der Außenlösung, NH_4 in Nährlösung und Wurzel gefunden werden.

Aus Nährlösung, Wurzel und oberirdischen Organen konnten Fällungen hergestellt werden, die in sterilen Nitratlösungen dieselbe Reduktion zu NO_2 und NH_4 bewerkstelligten, wie sie an den Kulturen auftrat.

Der Einfluß von Kohlehydraten im Lichte auf die Assimilation in grünen und farblosen Organen konnte getrennt untersucht werden.

Kulturmethode.

Unsere Methode sollte einerseits eine absolut sterile Anzucht und Kultur des verwendeten Samenmaterials ermöglichen, andrerseits auch stoffliche Veränderungen der Nährflüssigkeit leicht greifen lassen. Die Apparatur mußte so beschaffen sein, daß ein Ablassen und Wechseln der Nährlösung, ein Zuführen geringer Flüssigkeitsmengen auf vollkommen sterilem Wege möglich war. Wir hatten zu diesem Zwecke die bisher zur Anwendung gelangten Methoden kritisch gesichtet,[1] für unsere Zwecke aber keine geeignet gefunden und daher eine uns zusagende Apparatur zusammengestellt und durchgeprüft.

Fig. 1 zeigt das von uns hier benützte Kulturgefäß. Es besteht aus zwei Teilen, dem Unterteil *V*, der ein Fassungsvermögen von zirka 1 *l* besitzt, und einem glockenförmigen Oberteil *O*, der mittels Wattedichtung *w* dem Unterteil aufgesetzt wird. Zirka 5 *cm* unter dem oberen Rande des Unterteiles befindet sich eine Einschnürung *r*, auf die ein mit Organtin überspannter Glasring *g* aufgelegt wird, der zur Aufnahme der Samen dient. Auf die Art des verwendeten Organtins ist großes Gewicht zu legen: einerseits sollen die Würzelchen leicht in die Kulturflüssigkeit hindurchwachsen können, andrerseits darf der nachträglich aufgefüllte Sand nicht durchfallen. Knapp unter der Einschnürung befindet sich ein schräg nach aufwärts gerichteter seitlicher Tubus *t*, durch den ein mit gutsitzendem Kautschukstopfen eingesetztes Glasrohr bis an den Boden des Gefäßes läuft, das außen noch einen nach abwärts gerichteten seitlichen Ansatz trägt. An dem äußeren Ende dieses Glasröhrchens wird mit kurzem Schlauchstück ein Gabelstück angesetzt; der obere Ast trägt ein mit Watte gefülltes breites Röhrchen, das gewöhnlich zur Abhaltung von Verunreinigungen mit einer kurzen Eprouvette überdeckt ist und zum sterilen Durchlüften der Kulturflüssigkeit dient, am unteren Ast befindet sich ein kurzes Schlauchstück, das mit einem Jenaer Glasstopfen verschlossen ist und zum Nachfüllen von Flüssigkeit dient.

An dem nach unten gerichteten Ansatzstück ist mit einem längeren Schlauch ebenfalls ein Gabelstück angebracht, an dem mit Glasstopfen verschlossene kurze Schlauchstücke sitzen. Der eine Gabelast dient zur Entnahme von sterilen Proben aus der Kulturflüssigkeit, der andere zum Ablassen dieser. Um dies automatisch bewerkstelligen zu können, müssen die Enden der beiden Schlauchstücke tiefer angebracht werden als der Boden des Gefäßes

ist, so daß nach Abklemmen des das obere Gabelstück tragenden Schlauches die Flüssigkeit durch Heberwirkung nachgesaugt wird.

Das Einfüllen von Flüssigkeiten durch das Schlauchstück wird aus Kolben mit Syphons besorgt, die steril angeschaltet werden. Sollen jedoch nur wenige, genau dosierte Kubikzentimeter eingeführt werden, so werden die genau dosierten Flüssigkeitsmengen in starken Glasröhren, die an beiden Enden in Kapillaren auslaufen, eingeschmolzen, die Enden dicht mit Watte umhüllt, sterilisiert und hierau das eine Ende nach Entfernung der Watteumhüllung steril in das Schlauch-

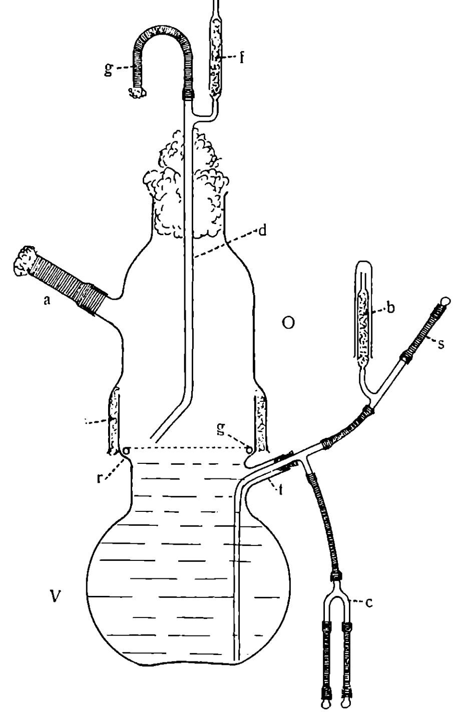


Fig. 1.

stück *s* eingeführt. Durch Abbrechen der beiden dünnen Enden wird die Flüssigkeit einfließen lassen.

Der Oberteil trägt einen seitlichen Tubus *a*, durch den die in einem eigenen Sterilisationsgefäß sterilisierten Samen steril eingeführt und auf des Netz fallen gelassen werden.

Zur Sterilisierung hat sich uns eine 1%-Bromlösung von 25 bis 30° am besten bewährt. Die am oberen verjüngten Ende des Oberteiles befindliche Öffnung ist mit einem dicken Wattepfropf verschlossen, durch den ein am unteren Ende schwach abgebogenes Rohr *d* bis nahe an das Samennetz läuft. Dieses Rohr dient einerseits zum Verteilen der Samen auf dem Organtin, andrerseits zum späteren Einfüllen von Sand und Tierkohle. Durch ein

seitlich angebrachtes, mit Watte gefülltes Glasrohr *f* kann nach Bedarf auch in den Oberteil sterile Luft eingeführt werden.

Sind die Keimlinge bis zur entsprechenden Höhe herangewachsen, wird durch das Schlauchstück *g* geglühter, steriler Sand (Quarzsand) bis etwa zu Dreiviertel des Kulturgefäßkragens eingefüllt und ebenso der oberste Teil mit feingepulverter, steriler Holz- oder Tierkohle bedeckt. Hierauf wird der Oberteil abgehoben. Die oberirdischen Teile der Pflanzen können sich ungehindert in freier Luft, die Wurzeln steril in der Flüssigkeit entwickeln. Durch die Schicht von Sand und Kohle, vorausgesetzt, daß sie nicht benetzt wird, ist eine Wurzelinfektion ausgeschlossen. Infolge der dichten Abschlußschicht muß nur täglich für gründliche Durchlüftung gesorgt werden.

Das Kulturgefäß wird so weit mit Nährlösung gefüllt, daß diese den Organtin fast berührt. Zum Sterilisieren werden sämtliche Ansatz- und Verbindungsstücke mit Watte umgeben und diese außerdem mit Pergament umwunden.

Gefäße und Glasröhren sind, um ein sicheres Arbeiten und besonders das bei jeder Manipulation nötige Abflammen zu ermöglichen, aus Jenaer Glas. Zur Prüfung der Nährlösung auf Sterilität werden wiederholt Impfungen auf Fleischbouillon und Nährlösungen für denitrifizierende Bakterien (nach Giltay und Iterson) vorgenommen. Eine Infektion kann auch so nicht übersehen werden, da in jedem solchen Fall ein massenhaftes Auftreten von Bakterien, beziehungsweise Pilzen auch makroskopisch sichtbar ist. Bezüglich aller weiteren Einzelheiten muß auf unsere Zusammenstellung verwiesen werden.

Literaturverzeichnis.

1. Benecke-Jost, Pflanzenphysiologie. 4. Aufl., Fischer, Jena, 1924, I. Bd., p. 231—51.

Czapek, Biochemie der Pflanze. II. Aufl., Fischer, Jena, 1920, II. Bd., 242 bis 327.

2. E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Protein, Berlin, 1906.

3. Baly E. C., Heilbronn J. M. and Hudson D. P., Photocatalysis II. Journ. Chem. Soc., London, 1922, *121*, 10—78.

Baly E. C., Heilbronn and Stern H. J., Photocatalysis III. Journ Chem. Soc., London, 1923, *123*, 185.

4. Riffart H., Bioch. Ztschr., 1922, *131*, p. 78.

5. Treub, Ann. jard. Buitenzorg, 1895, *13*, I., 1905 (Ser. 2), *4*, 86, 1907, *6*, 79, 1909, *8*, 15.

6. Brunswik H., Sitzber. d. Akad. d. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., 1921, *130*, 387.

7. Loew, Biochem. Ztschr., 1912, *41*, 224.

8. Kostytschew G. und Tswetkowa E., Über die Verarbeitung der Nitrate in org. Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze. Ztschr. f. physiol. Chemie, 1920, III, 173.

9. Godlewski E. und Polzeniucz, Anz. d. Akad. d. Wiss. Krakau, 1911, p. 227.

Nabokich A., Ber. d. D. bot. Ges. 1903, *21*, 398 (siehe auch *8*, p. 175).

10. Schreiner und Sullivan, Bot. Gazette, 1911, *51*, 121.

11. Davidson W., The Journal of biolog. Chemistry, 1919, *37*, 143.

12. Molisch H., Über einige Beziehungen zwischen anorg. Stickstoffsalzen mit der Pflanze. Sitz.-Ber. d. Akad. d. Wiss. Wien, 1887.

Klein R., Über den Nachweis und das Vorkommen von Nitraten und Nitriten in Pflanzen. Beih. z. bot. Zentralbl., 1913, *30*, 141.

13. Eckerson S. H., Protein-Synthesis by Plants, I Nitratereduktion. Bot. Gazette, 1924, *77*, 377.

14. Werner O., Die mikrochemische Charakterisierung der *a*-Monoaminosäuren. Mikrochemie, Wien, Jahrg. I, p. 35 (1923).

15. Molisch H., Über den mikrochem. Nachweis von Nitriten und Nitraten in der Pflanze mittels Diphenylamin oder Brucin. Ber. d. D. bot. Ges., 1883, I, 150.

16. Warburg O. und Negelein E., Über die Reduktion der Salpetersäure bei grünen Zellen. Biochem. Ztschr., 1920, *110*, 66.

17. Kostytschew S., Pflanzenatmung. Berlin, 1924, 138.

18. Tröndle A., Ber. d. D. bot. Ges., 1909, *27*, 71.

Lepeschkin, Ber. d. D. bot. Ges., 1908, *26*, 198, 231, 724.

19. Klein G. und Kisser J., Die sterile Kultur höherer Pflanzen. Botan. Abhandlungen, Heft 2, Goebel, München.

20. Grieß P., Treadwell, analythische Chemie II., 1922, p. 295.

21. Neßler, » II., 1922, p. 53.

22. Hansteen-Cranner B., Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen. Meldinger fra Norges Landbrukshøiskole, Bd. 2, H. 1—2, Kristiania, 1922.

23. Krüger-Reich, Ztschr. f. physiol. Chemie, 1903, *39*.

24. Revoltella, Biochem. Ztschr., *134*, 149.

25. van Slyke D., Abderhalden, Handbuch d. biolog. Arbeitsmeth., Abt. I, Teil 7, H. 2.

26. Klein G. und Pirschle K., Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei der pflanzlichen Atmung. Bioch. Ztschr., 1926.

27 Baudisch und Mayer, Studien über die Reduktion der Nitrite Nitrate, Biochem. Ztschr., 1920, *107*.

28. Laurent, Reduktion der Nitrate im Sonnenlicht. Bull. de l'Akad. roy. de science d. Belgique, *21*, 387

29. Baudisch und Mayer E., Photochem. Studien zur Nitrat- und Nitrit-assimilation. Ztschr. f. physiol. Chem., 1914, *89*, 175.

Journ. of Biolog. Chem., 1921, *48*, 489.

Science, 1923. 451.

Siehe auch Pincussen L., Biolog. Lichtwirkungen und ihre physik. und chem. Grundlagen, Ergebnisse der Physiologie 1921, 19. Bd., p. 79.

30. Mazè, Compt. rend., 1911, *153*, 357.

31. Bach A., II. Biochem. Ztschr., 1911, *33*, 282;
III. 1912, *38*, 154;
IV 1913, *52*, 412.

32. Pozzi-Escot M. Em., Amer. Chem. Journ., 1903, *29*, 517.

33. Kastle J. H. und Elvove E., Amer. Chem. Journ., 1904, *31*, 608.

34. Neuberg C., Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten I. Biochem. Ztschr., 1908, *13*, 305;

Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten IV. Biochem. Ztschr., 1910, *29*, 279.

35. Anderson V L., Some observations on the nitrate reduc. properties of plants. Ann. of Botany, 1924, *38*, 699.